

UNTERSUCHUNGEN ZUR ZYTOTOXIZITÄT
UND BEEINFLUSSUNG DER
PROLIFERATIONSKINETIK
DURCH HYDROXYHARNSTOFF
AM YOSHIDA-ASZITESSARKOM
UND KNOCHENMARK DER RATTE

Clauspeter Pfundmair

1977

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 • Corneliusstraße 21 • Tel.: 268177

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK II
DES KLINIKUMS GROSSHADERN
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Komm. Direktor: Prof. Dr. H. -J. KARL

UNTERSUCHUNGEN ZUR ZYTOTOXIZITÄT
UND BEEINFLUSSUNG DER
PROLIFERATIONSKINETIK
DURCH HYDROXYHARNSTOFF
AM YOSHIDA-ASZITESSARKOM
UND KNOCHENMARK DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Clauspeter Pfundmair
aus Friedberg/Schwaben

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. EHRHART
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. -H. KARL
Dekan:	Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.1977



INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	5
2.	MATERIAL	10
3.	METHODEN	13
4.	ANORDNUNG DER VERSUCHE	20
4.1.	Bestimmung der Halbwertszeit von Hydroxyharnstoff im Aszites	20
4.2.	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Hydroxyharnstoff im Aszites	20
4.2.1.	einmalige Verabreichung von Hydroxyharnstoff	20
4.2.2.	12-stündige Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion	21
4.3.	Bestimmung der Zytotoxizität von Hydroxyharnstoff	22
4.3.1.	Yoshida-Aszitessarkomzellen	23
4.3.2.	Knochenmarkszellen	24
4.4.	Proliferationskinetik des Yoshida-Aszitessarkoms nach Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion	24
5.	ERGEBNISSE	26
5.1.	Halbwertszeit von Hydroxyharnstoff im Yoshida-Aszitessarkom	26
5.2.	Minimale Hemmkonzentration von Hydroxyharnstoff im Yoshida-Aszitessarkom	26
5.3.	Zytotoxizität von Hydroxyharnstoff nach Dauerinfusion	30
5.3.1.	Yoshida-Aszitessarkomzellen	30
5.3.2.	Knochenmarkszellen	37
5.4.	Proliferationskinetik des Yoshida-Aszitessarkoms nach Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion	39
6.	DISKUSSION	43

7.	ZUSAMMENFASSUNG	51
8.	LITERATURVERZEICHNIS	52

1. EINLEITUNG

Ein besonderes Anliegen der Medizin ist die Tumorthherapie. Gerade in letzter Zeit konnten mit dem verbesserten Stand der Forschung neue Therapieformen eingeführt werden. Neben der chirurgischen Beseitigung des Tumors, die überwiegend dann durchgeführt werden sollte, wenn der Tumor in toto entfernt werden kann, oder der Röntgenbestrahlung, wenn der Tumor röntgensensibel ist, kommt die Chemotherapie zur Anwendung. Sie ist besonders bei generalisiert auftretenden Tumoren des erythropoietischen, myeloischen oder lymphatischen Systems oder solider Tumoren indiziert. Hormonabhängige Gewebe, wie das Mamma-, Ovarial-, Prostata- und Endometriumkarzinom bieten einen günstigen Angriffspunkt für die Hormontherapie (Kepp und Mitarbeiter, 1971; Zollinger, 1971; Drings, 1975; u. a.). Durch Immuntherapie wird versucht die Abwehr des Körpers gegen die Tumorzellen zu aktivieren, z. B. bei der Behandlung des malignen Melanoms (Steigleder, 1972; Daniel, 1976; u. a.). Das Hauptaugenmerk der Therapie systemisierter Tumoren liegt aber bei der Chemotherapie mit Zytostatika, die in den Zellzyklus der Tumorzelle eingreifen. Die Palette der Substanzen ist vielfältig. Sie reicht von radioaktiven Isotopen, z. B. P^{32} zur Behandlung von Polyzytämie, über alkylierende Substanzen (Cyclophosphamid, Busulfan, usw.) und Antimetaboliten (Amethopterin, Azathioprin, usw.), bis hin zu den Antimitotika (Vinblastin, Vincristin, usw.) und zytostatisch wirkenden Antibiotika (Zollinger, 1971; Kuschinsky, 1972; Drings, 1975; u. a.). Die Erfolgsquote bei Monotherapie mit einer dieser Substanzen allein ist aber relativ gering, denn Tumorzellen teilen sich nicht synchron. Durch die Gabe eines Zytosta-

tikums können nur Zellen getroffen werden, die sich in der Zellzyklusphase befinden, in der das Mittel seine größte Wirksamkeit besitzt. So wirken z. B. alkylierende Substanzen, Folsäure- und Purinantagonisten vorwiegend S-Phasen-spezifisch. In der G_2 -Phase sprechen alkylierende Substanzen in niedriger Dosierung an, in der Mitosephase die Antimitotika.

Um effektive Monotherapie betreiben zu können, muß die Chemotherapie über längere Zeit durchgeführt werden. Dabei kommt es zu einer schweren Schädigung der physiologischen Mausergewebe.

Um die chemotherapeutische Tumorthherapie effektiver zu machen und die Schäden an proliferierendem Gewebe gering zu halten, könnten theoretisch Tumorzellen vor der Therapie synchronisiert werden; in einem 2. Therapieschritt ließe sich dann mit einer zum richtigen Zeitpunkt gegebenen zytoziden Substanz eine größere Anzahl an Tumorzellen vernichten.

Als sogenannte Synchronisationsmittel werden hauptsächlich verwandt: Vincristin (Klein und Mitarbeiter, 1970 und 1972; Maidhof und Mitarbeiter, 1975; u. a.), Flurouracil (Nitze und Mitarbeiter, 1968, 1971 und 1972; u. a.) und Hydroxyharnstoff (Kennedy, 1970; Bloomfield und Mitarbeiter, 1973; Hartenstein und Mitarbeiter, 1975 und 1976; Sauer und Mitarbeiter, 1976; u. a.). Der 2. Behandlungsschritt kann mit ionisierenden Strahlen (Mauro und Mitarbeiter, 1969; Nitze und Mitarbeiter, 1972; Piver und Mitarbeiter, 1972; u. a.) oder mit Zytostatika (Schneider, 1965; Klein und Mitarbeiter, 1970; Bloomfield und Mitarbeiter, 1973; Drings, 1975; Hartenstein und Mitarbeiter, 1975; u. a.) durchgeführt werden. Voraussetzung für diese Therapie ist die Kenntnis der Zellzykluszeiten der Tumoren, um das zytozide Mittel in der

Zellzyklusphase zu verabreichen, in der es wirksam ist. Von einigen tierischen und menschlichen Tumoren wurden bereits die Zellzyklus- und Generationszeiten bestimmt (Lennartz und Mitarbeiter, 1968 und 1971; Rajewsky und Mitarbeiter, 1971; Klein und Mitarbeiter, 1972; Steel, 1972; u. a.). Vorteil einer sogenannten Synchronisationstherapie gegenüber der zeitlich nicht determinierten Monotherapie wäre die größere Effektivität, die kürzere Anwendungsdauer der zytoziden Substanzen und die weitgehende Schonung von Normalgeweben infolge zum Tumor unterschiedlicher Zellzykluszeiten. Unsere Untersuchungen mit Hydroxyharnstoff als Synchronisationsmittel am Yoshida-Aszitesarkom der Ratte stellen Grundlagenuntersuchungen zur sogenannten Synchronisationstherapie menschlicher Tumoren dar.

Hydroxyharnstoff blockiert die Zellen im Zellzyklus beim Übergang von der präsynthetischen G_1 -Phase zur DNS-Synthesephase. Biochemisch wird die Bildung von Desoxycytidylsäure aus Cytidylsäure inhibiert (Young und Mitarbeiter, 1967; Yarbo, 1968), wahrscheinlich durch Hemmung des Ribonukleotid-Reduktase-Systems (Krakoff und Mitarbeiter, 1968). Allerdings hat Hydroxyharnstoff auch eine direkte zytotoxische Wirkung auf Zellen in der S-Phase (Phillips und Mitarbeiter, 1967; Farber und Mitarbeiter, 1969; Morse und Mitarbeiter, 1970; Rickard und Mitarbeiter, 1970). Hydroxyharnstoff wird teilweise unverändert über die Nieren ausgeschieden (Rosner und Mitarbeiter, 1971), der größte Teil aber in der Leber abgebaut (Rajewsky und Mitarbeiter, 1971). Die Dauer und Intensität der G_1 S-Blockade ist von der Aufrechterhaltung der nötigen Hydroxyharnstoffkonzentration abhängig (Pfeiffer und Mitarbeiter, 1967; Sinclair, 1967; Young und Mitarbeiter, 1967).

Ziel unserer Untersuchungen war, eine Synchronisation möglichst aller

proliferierenden Tumorzellen zu erreichen, und damit die Schädigung dieser Zellen gering zu halten. Um die Toxizität von Hydroxyharnstoff möglichst niedrig zu halten, mußten Halbwertszeit, minimale Hemmkonzentration und Zellverlustrate erarbeitet werden. Yoshida-Sarkomzellen und Knochenmarkszellen der Ratte dienten für diese Untersuchungen als Modellsysteme. Das Yoshida-Aszitessarkom der Ratte ist wegen seiner hohen growth fraction (93 %) und seiner kurzen Generationszeit von 19 Stunden bei einer S-Phasendauer von 9 Stunden zur Untersuchung der Proliferationskinetik unter Zellsynchronisationsbedingungen geeignet (Lennartz, 1968; Hartenstein und Mitarbeiter, 1976; u. a.). Die Verabreichungsdauer von Hydroxyharnstoff betrug bei unseren Versuchen 12 Stunden in Form einer intraaszitären Dauerinfusion. Das empfindliche Knochenmark ist bei Anwendung von zytostatischen und zytoziden Substanzen ein guter Gradmesser für Schäden, die vergleichsweise an anderen physiologischen Proliferationsgeweben auftreten.

Um alle Zellen, die sich im Zellzyklus befinden, durch Hydroxyharnstoff am Übertritt von der G_1 - zur S-Phase zu hindern, bzw., um sie dort aufzustauen, muß eine Blockadezeit gewählt werden, die der Differenz Generationszeit (T_C) minus DNA-Synthesezeit (T_S) entspricht. Eine längere Blockadedauer vermindert die proliferative Kapazität der Zellen durch toxische Schädigung (Sinclair, 1967; Rajewsky und Mitarbeiter, 1971).

Wichtig für eine optimale Blockade ist, die Hemmkonzentration von Hydroxyharnstoff so zu wählen, daß möglichst viele Zellen am Übergang von der G_1 -Phase zur S-Phase aufgestaut werden, da sie beim Eintritt in die S-Phase von Hydroxyharnstoff letal getroffen werden (Philips und Mitarbeiter, 1967; Sinclair, 1967; Farber und Mitarbei-

ter, 1969; Dethlefsen und Mitarbeiter, 1973; u. a.).

In vivo-Versuche, wie diese, geben die Situation in einem Organismus wirklichkeitsgetreuer wieder als in vitro-Versuche.

In vivo-Versuche sind materialaufwendiger: Die Anzahl der Tiere, die bis zum Schluß der Versuchsreihe verwendet werden können, hängt von der physischen Konstitution der Tiere ab. Voraussetzung ist ein sorgfältiges und schonendes Arbeiten. Wir konnten rund 25 % der für die Versuche bestimmten Tiere nicht verwerten.

2. MATERIAL

2.1. Versuchstiere:

Weibliche Wistarratten (SPF-Wistar AF/HAN) mit einem Körpergewicht von 180 - 200 g. Tierhaltung unter gleichen Bedingungen: Altromin-Standarddiät und Wasser ad libitum. Zucht: Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover.

2.2. Tumor:

Yoshida-Aszites-Sarkom ⁺), gehalten in Wistarratten.

2.3. Hydroxyharnstoff (HU), als Hydroxyharnstoff reinst, bezogen von der Firma Suchart, München.

2.4. Nährlösung für Kurzzeitinkubation:

TCM 199-Hepes von der Fa. Gipro-Bio-Cult, Glasgow, Scotland.

2.5. 3-H-Thymidin (als 6-H³-Thymidin) mit einer spezifischen Aktivität von 5 Ci/mmol, von der Fa. Radiochemical Centre, Amersham, England.

2.6. Autoradiographie-Material:

Methanol und Aqua dest.

0,5 %ige Gelatine

70 %iges und 96 %iges Äthanol

Schneideplatte, Filterpapier, ein Messer, eine Pinzette

Kodak AR 10 Strippingfilm

⁺) Wir danken Herrn Prof. Rabes, Pathologisches Institut der Universität München, für die Überlassung des Tumormaterials.

Entwickler, bestehend aus

9 g Amidol
 36 g Na-Sulfit (wasserfrei)
 16 ml Kaliumbromid
 2 l Aqua dest.

Fixierer, bestehend aus

60 g Ka-Disulfit
 600 g Na-Thiosulfat-5-hydrat
 2 g Chromalaun
 2 l Aqua dest.

2.7. Färbelösung für Zellausstriche:

Giemsa, bestehend aus

Azur-II-Eosin	3,0
Azur II	0,8
Glyzerin (spez. Gewicht 1,26)	250,0
Methanol	250,0

in weißer Pufferlösung:

5 ml weißer Puffer nach Weise
 ad 1000 ml Aqua dest.

2.8. Materialien für die Konzentrationsbestimmung von Hydroxynharnstoff (nach Fabricius und Mitarbeiter, 1971):

1 und 0,5 molare PCA
 Puffer, bestehend aus 50 ml 0,5 M Na_2HPO_4 ,
 8,9 ml 1,5 M NaH_2PO_4 und 42,8 ml H_2O
 8,5 und 6 N NaOH
 1 %ige Sulfanilsäure (2-3 Monate haltbar)
 0,1 N Jodlösung und 2,5 %igem KJ
 0,1 M Na-Thiosulfat (1,24 g/50 ml Aqua dest.)

N_{α} -NED: 50 mg N_{α} -Naphthyläthylendiamin-Dihydrochlorid +
8,75 ml 12 N NCl in 50 ml Aqua dest.

- 2.9. Spezialkäfige für die Dauerinfusion: Abnehmbarer Deckel aus Messinggitter mit Wasserflasche; Wände aus Plexiglas, in der Rückwand des Käfigs ein 0,5 cm breiter, 1 cm langer Schlitz. Boden: abnehmbar, Ränder aufgebogen, schließen mit den Plexiglaswänden ab.
- 2.10. Sterivenkatheter mit Rekordansatz, Größe E 2 50 cm lang, von der Fa. Sterimed, München
- 2.11. Narkoseäther, reinst
- 2.12. Zur Bestimmung von Aszites- und Knochenmarkszellzahlen: Leuko-, Erypipetten, Neubauerzählkammern.
- 2.13. Materialien zur Knochenmarksaufbereitung:
 - Präparierbesteck
 - Säge
 - Injektionsnadeln mit 2 mm Durchmesser
 - 20 ml Rekordspritzen
 - Aluminiumfolien
 - Quarzfritten mit einer Porengröße von 30 μ m
 - Saugflaschen mit durchbohrten Gummistöpseln.

3. METHODEN

3.1. TRANSPLANTATION DES TUMORS

5 Tage vor Versuchsbeginn werden den Tieren $1 - 1,5 \cdot 10^8$ Zellen des Yoshida-Aszitessarkoms transplantiert. Nach 5 Tagen ist exponentielles Wachstum des Tumors gewährleistet. Zum Versuch werden nur Tiere mit reichlicher Aszitesbildung verwandt.

3.2. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON HYDROXYHARNSTOFF IM ASZITES

(Methode nach Fabricius und Mitarbeiter, 1971)

Zur Konzentrationsbestimmung wird jeder Ratte 0,5 ml Aszites entnommen und in 4,5 ml aqua dest. eingebracht. Die Zellverbände zerkleinert man mit dem Ultraturrax (ca. 30 sec. bei mittlerer Umdrehungsgeschwindigkeit, mit Eis gekühlt). Durch Zugabe von 5 ml 1 N PCA werden die Zellen denaturiert. Anschließend wird das Zelleiweiß bei 3000 U/min. 20 Min. lang abzentrifugiert. Dann trennt man mit einem Filter, das zuvor mit 0,5 N PCA angefeuchtet wurde, das ausgeflockte Eiweiß von der übrigen Lösung. (Die Filtrate sind bei -20°C haltbar.) Vor der Konzentrationsbestimmung müssen jedesmal Na-Thio-sulfat und N_α -NED-Farbstoff frisch angesetzt werden. Beide Lösungen sind nicht haltbar. Bei der N_α -NED-Herstellung ist zu beachten, daß der Farbstoff erst nach dem Erkalten des Gemisches aus aqua dest. und 12 N HCl zugegeben werden darf. Zur Bestimmung des O-Wertes

für die photometrische Untersuchung der Hydroxyharnstoff-Proben nimmt man 1 ml aqua dest. und 1 ml 1 N PCA. Für die Hydroxyharnstoff-Bestimmung benötigt man 2 ml von jeder Probe. Dazu gibt man 1 ml vom Puffergemisch, das einen pH von 7,5 haben soll. Dann wird 0,05 ml 8,5 N NaOH und 1 ml Sulfanilsäure hinzupipettiert. Nach erneuter pH-Messung soll der pH-Wert der Proben zwischen 6,9 und 7,3 liegen. Falls er unter 6,9 liegt, wird mit 1 N NaOH, falls er über 7,3 liegt, mit 1 N HCl ausgeglichen. Anschließend mischt man 0,1 ml Jodlösung zu und schüttelt das ganze kräftig durch. Genau nach einer Minute wird 0,1 ml Na-Thiosulfatlösung zugegeben, dann 1 ml eisgekühltes N_{α} -NED-Reagenz. Nach 20 Min. liest man die Farbentwicklung bei 540μ am Spektralphotometer ab. Wegen der starken Farbentwicklung muß der Ansatz meist 1 : 9 oder 1 : 4 verdünnt werden. Die Konzentration wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Extinktion} \cdot 10 \cdot 10 \cdot 1,3 = \text{Konzentration des Ansatzes in } 10^{-5} \text{ mol/l}$$

3.3. BESTIMMUNG DES H^3 -THYMIDIN-INDEXES

Unter dem H^3 -Thymidin-Index versteht man das Verhältnis von H^3 -Thymidin markierten zu unmarkierten Zellen. Der H^3 -Thymidineinbau in den Zellkern ist ein Maß für die DNS-Synthese der Zelle. H^3 -Thymidin wird in der S-Phase in die DNS eingebaut. Durch das sehr gute autoradiographische Auflösungsvermögen infolge niedriger mittlerer Energie der β -Teilchen dieses Isotops ist es ein geeigneter Indikator für die DNS-Synthese (Wittmann, 1970).

3.3.1. Bestimmung bei In-vitro-Markierung

Zur Bestimmung des H^3 -Indexes wird den Tieren 0,2 ml Aszites entnommen und 30 Minuten in 1,8 ml TCA-Medium mit $10 \mu\text{Ci } H^3\text{-Thy-}$ midin bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Anschließend wird das nicht in die DNA eingebaute H^3 -Thymidin eliminiert; Dreimaliges Aufschwemmen der Zellen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung und Zentrifugation bei 900 U/min. Zwischen jedem Spülvorgang wird der Überstand abgesaugt. Zuletzt fertigt man aus dem Bodensatz Zellausstriche an. Sie werden 20 Min. in Methanol und 20 Min. in destilliertem Wasser fixiert. Die Rückseite der Präparate bestreicht man mit 0,5 %iger Gelatine, damit der Film besser haftet. Nun werden die Präparate in der Dunkelkammer mit dem Kodak AR 10 Strippingfilm beschichtet; Einlegen der Filmplatte (mit der Filmbeschichtung nach oben) 5 Min. in 70 %iges Äthanol; Zerteilen des Filmes in der Schneideplatte in 8 gleiche Teile; zum Lösen der Filmschicht Eintauchen der Platte für 2 Min. in 96 %iges Äthanol; Einbringen der einzelnen Stückchen in aqua dest. und Aufziehen auf die Objektträger. Daraufhin werden die Präparate 3 Stunden lang im Trockenschrank getrocknet und anschließend in lichtdicht abgeschlossenen Kästchen 7 Tage bei 4°C im Kühlschrank exponiert. Die Kästchen sind mit Kieselgel gefüllt, das ein trockenes Milieu garantiert. Danach werden die Autoradiographien entwickelt; 6 Min. Einlegen in den Entwickler; 20 Min. bei 18°C Fixierbad; 2 Stunden Wässern der Präparate; 2 Stunden Trocknen der Präparate. Die Präparate färbt man 25 Min. in Giemsa-Lösung; 5 ml Giemsa auf 100 ml weißen Puffer. Der Restfilm auf der Rückseite der Objektträger wird mit dem Messer entfernt. Jetzt kann der H^3 -Index bestimmt werden; Pro Präparat zählt man von 1000 Zellen die radioaktiv markierten.

3.3.2. Bestimmung bei In-vivo-Markierung

1 Stunde vor Versuchsende wird den Tieren $0,8 \mu\text{Ci/g}$ Körpergewicht H^3 -Thymidin intraperitoneal injiziert. Am Ende der Hydroxyharnstoff-Exposition wird der Aszites dreimal mit $0,9\%$ iger NaCl aufgeschwemmt und anschließend zentrifugiert, um nicht DNS-gebundenes H^3 -Thymidin auszuwaschen. Die Herstellung der Autoradiographien und die Auszählung der Präparate erfolgt wie in 3.3.1. beschrieben.

3.4. BESTIMMUNG DES MITOSE-INDEXES

Von $0,05 \text{ ml}$ Aszites werden Ausstriche angefertigt und, sobald sie getrocknet sind, mit Giemsa gefärbt. Pro Präparat werden 1000 Zellen ausgezählt und es wird der Prozentsatz der Zellen ermittelt, die sich gerade in der Mitose befinden.

3.5. DURCHFÜHRUNG DER 12-STUNDEN-DAUERINFUSION

Die Tiere werden in einer Glastrommel mit Äther narkotisiert. Dann führt man den Sterivenkatheter im linken unteren Quadranten des Abdomens durch die Punktionsnadel unter das Peritoneum ein. Damit die Ratte während dieser Manipulation schmerzfrei bleibt, wird die Narkose mit einem Äther getränkten Wattebausch fortgesetzt. Nach Zurückziehen der Hohnadel und Festnähen des Schlauches am Fell um-

wickelt man die Tiere bis zu den Vorderpfoten mit ca. 8 cm breiten Mullbinden. Dieser Verband wird fest mit Heftpflaster um die Vorderpfoten, um den Bauch und um die Hinterpfoten fixiert. Nun setzt man die Ratten mit der ganzen Verpackung in die Spezialkäfige. Der Schwanz und der gelegte Infusionsschlauch werden durch die Öffnung in der Rückwand des Käfigs geleitet. Über das Tier stülpt man eine Pappröhre mit einem Durchmesser von 8 cm, um zu verhindern, daß es sich aus dem Verband befreit und den zuführenden Infusionsschlauch durchbeißt. Den Schwanz fixiert man mit Leukoplaststreifen außen an der Rückfläche des Käfigs, die Pappröhre, in der die Ratte sitzt, am Käfigboden. Dann kann nach der Injektion des Hydroxyharnstoff-Pulses die Dauerinfusion angeschlossen werden.

3.6. BESTIMMUNG DES ZELLVERLUSTES BEI ASZITESZELLEN

Vor und nach Hydroxyharnstoff-Exposition werden den Tieren einige Tropfen Aszites abpunktiert und in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl/ml ermittelt. Um festzustellen, ob ein Zellverlust vorliegt oder nicht, muß der Verdünnungseffekt durch das Lösungsmittel berücksichtigt werden. Der Verdünnungseffekt wird ermittelt, indem man den mit Hilfe der Kontrolltiere errechneten Verdünnungskoeffizienten mit der vor Hydroxyharnstoff-Exposition gemessenen Zellzahl multipliziert:

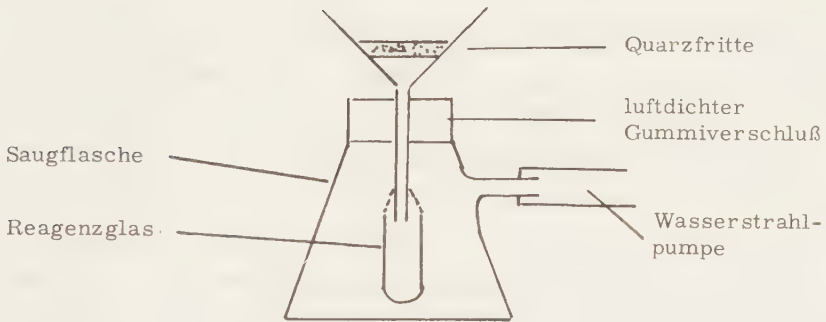
$$\text{Verdünnungskoeffizient} = \frac{\text{Asziteszellzahl der Kontrollen nach Behandlung mit 0,9 \%iger NaCl}}{\text{Asziteszellzahl der Kontrollen vor Versuchsbeginn}}$$

Die Kontrolltiere werden den gleichen Bedingungen ausgesetzt wie die übrigen Tiere, jedoch mit 0,9 %iger NaCl, statt mit Hydroxyharnstoff infundiert. So kann man annehmen, daß eine Verminderung der Asziteszellzahl am Ende der 0,9 %igen NaCl-Exposition auf einer Verdünnung des Aszites und nicht auf Zellverlust beruht. Vergleicht man den errechneten Verdünnungswert mit den nach HU-Exposition gemessenen Werten und stellt man fest, daß der errechnete höher ist als der gemessene Wert, so müssen Asziteszellen untergegangen sein.

3.7. BESTIMMUNG DER KNOCHENMARKSZELLZAHL

Den getöteten Ratten wird ein Femur herauspräpariert: Nach Aufschneiden des Fells wird der Rattenfemur flektiert, so daß die Oberschenkelmuskulatur vorspringt. Diese wird bis zum Hüftgelenk abpräpariert. Sobald die Sehnen und Bänder durchtrennt sind, kann der Femur exartikuliert und herausgezogen werden. Durch Hyperextension im Kniegelenk wird der Bandapparat gelockert und dann mit der Schere durchtrennt. Anschließend entfernt man die restliche Muskulatur und das Periost mit dem Knochenschaber. An den Epiphysen wird der Femur aufgesägt, an einer Öffnung die Spritzennadel mit 2 mm Durchmesser in die Spongiosa gedrückt und mit der 20 ml-Rekordspritze das Knochenmark auf eine vorher gewogene Aluminiumfolie ausgeblasen. Dann wiegt man die Alu-Folie mit Knochenmark. Nach Abziehen des Alu-Foliengewichtes ergibt sich das Gewicht des Knochenmarkes. Das Knochenmark wird nun mit 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung durch eine Quarzfritte, die zuvor mit 1 ml 0,9 %iger NaCl angefeuchtet wurde, in ein Reagenzglas gespült. Dieses hängt in einer luftdicht abgeschlos-

senen Saugflasche. Den nötigen Unterdruck erzeugt eine Wasserstrahlpumpe.



Die Fritte hat eine Porengröße von 30μ und läßt deswegen vorwiegend Einzelzellen durch das Filter schlüpfen. Die Spongiosa wird zurückgehalten. In der aufgefangenen Spülflüssigkeit läßt sich nun die Zahl der Knochenmarkszellen ermitteln: Nach Verdünnung der Knochenmarkszell-Lösung in Leukopipetten zählt man die Zellen bei 480facher mikroskopischer Vergrößerung in der Neubauer-Zählkammer, wobei nur kernhaltige Zellen, keine Erythrozyten, berücksichtigt werden.

Um die Zellzahlen der verschiedenen Tiere miteinander vergleichen zu können, werden die gemessenen Zellzahlen auf ein Gramm Knochenmark hochgerechnet. Bei diesen ermittelten Werten handelt es sich um Näherungswerte der Zellzahlen pro Gramm Knochenmark. Sie sind als Vergleichszahlen zu interpretieren, da das Knochenmark bei allen Tieren nach der gleichen Methode aufbereitet wurde. Aufgrund der unsanften Trennung von Spongiosa und Knochenmarkszellen wird sehr wahrscheinlich ein Teil der Zellen zerstört.

4. ANORDNUNG DER VERSUCHE

4.1. BESTIMMUNG DER HALBWERTSZEIT VON HYDROXYHARNSTOFF IM YOSHIDA-ASZITESSARKOM NACH EINMALIGER GABE VON 0,5 mg HYDROXYHARNSTOFF/g RATTE

15 Ratten wurden 5 Tage vor dem Versuch $1 - 1,5 \cdot 10^8$ Zellen des Yoshida-Aszitessarkoms intraperitoneal implantiert. Am 6. Tag erhielt jede Ratte 0,5 mg/HU/g Körpergewicht i.p. Zur Konzentrationsbestimmung entnahmen wir jeder Ratte in der 1. Stunde alle 10 Min., dann nur noch alle 60 Min. bis zur 6. Stunde 0,5 ml Aszites (Konzentrationsbestimmung siehe 3.2.). Die gewonnenen Konzentrationswerte wurden semilogarithmisch zur Zeit aufgetragen. Aus der linearen Eliminationskurve von Hydroxyharnstoff konnte dann die Halbwertszeit von HU ermittelt werden.

4.2. BESTIMMUNG DER MINIMALEN HYDROXYHARNSTOFFHEMMKONZENTRATION IM YOSHIDA-ASZITESSARKOM

4.2.1. nach einmaliger Gabe von 0,5 mg Hydroxyharnstoff/g Ratte

Denselben 15 Tieren von Versuch 4.1. wurde neben 0,5 ml Aszites für die Konzentrationsbestimmung auch 0,2 ml Aszites alle 60 Min.

bis zur 8. Stunde entnommen und davon der H^3 -Thymidin-Markierungsindex bestimmt, der ein Parameter für die DNS-Synthesezeit der Tumorzellen ist (Pilgrim und Mitarbeiter, 1965; Schultze, 1967; Wittmann, 1970; Zollinger, 1971; u. a.). Ein Ansteigen des H^3 -Thymidin-Markierungsindex bedeutet, daß die Blockade von Hydroxyharnstoff aufgehoben ist, und die Zellen aus der präsynthetischen G_1 -Phase in die DNS-Synthesephase (S-Phase) einlaufen. Wir korrelierten die zu jeder Stunde ermittelten H^3 -Thymidin-Markierungsindices der Asziteszellen mit der Hydroxyharnstoffeliminationskurve (der gemeinsame Parameter dabei war die Zeit) und konnten so die minimale Hemmkonzentration von HU aus der Kurve entnehmen: Sie wird zu dem Zeitpunkt unterschritten, bei dem der Index wieder ansteigt.

4.2.2. nach 12-Stunden-Dauerinfusion

5 Tage vor Versuchsbeginn wurden 15 Tieren $1 - 1,5 \cdot 10^8$ Yoshida-Aszitessarkomzellen i.p. transplantiert. Am 6. Tag legten wir die Dauerinfusionen an. Um den ganzen Bereich von $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l bis $7,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l, den Hemmungsbereich nach einmaliger HU-Gabe, genau ausloten zu können, wurden 6 verschiedene Infusionslösungen vorbereitet. Jeder Dauerinfusion ging ein HU-Puls voraus, um gleich von Anfang an die Zellen in ihrer DNS-Synthese zu blockieren. Puls und Dauerinfusion wurden wie folgt zusammengestellt:

	Puls mg/g KG	Dauerinfusion mg/g KG 12 Std.	= durchschnittliche Endkonzentration mol/l
I.	0,152	1,276	$3,15 \cdot 10^{-3}$
II.	0,076	0,638	$2,2 \cdot 10^{-3}$
III.	0,057	0,51	$0,98 \cdot 10^{-3}$
IV.	0,076	0,638	$1,2 \cdot 10^{-3}$
V.	0,057	0,51	$8,8 \cdot 10^{-4}$
VI.	0,0568	0,357	$6,7 \cdot 10^{-4}$

Zur 11. Stunde injizierten wir jeder Ratte $0,8 \mu\text{Ci/g H}^3$ -Thymidin. Zur 12. Stunde wurden die Tiere getötet, aus dem Abdomen $0,5 \text{ ml}$ Aszites zur Konzentrationsbestimmung und $0,2 \text{ ml}$ für die Bestimmung des H^3 -Thymidin-Markierungsindex abpunktiert. Nach der HU -Konzentrationsbestimmung (siehe 3.2.) und der Auszählung der H^3 -Thymidinmarkierten Zellen, wurde die Konzentration nach der 12-Stunden-Infusion in Korrelation zum H^3 -Index gesetzt.

4.3. BESTIMMUNG DER ZYTOTOXISCHEN WIRKUNG

12-STÜNDIGER HYDROXYHARNSTOFF-DAUERINFUSIONEN MIT VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN

Diese Versuchsreihe führten wir mit 21 Tieren durch. 11 von Ihnen wurden unmittelbar nach der Dauerinfusion getötet, zehn 24 Stunden nach Abschluß der Dauerinfusion. Für den ersten Teil des Versuchs hatten wir 3 Kontrolltiere, für den zweiten 2. Vor Versuchsbeginn wurde allen Tieren ein Tropfen Aszites zur Zellzahlbestimmung abpunktiert. Anschließend perfundierten wir die Tiere mit folgenden Konzentrationen:

	Puls mg/g KG	Dauerinfusion mg/g KG 12 Std.
I.	0,152	1,276
II.	0,076	0,638
III.	0,152	0,51
IV.	0,076	0,638
V.	0,057	0,51
VI.	0,0568	0,357

Den Kontrolltieren wurde bei gleicher Einlaufgeschwindigkeit statt Hydroxyharnstoff 0,9 %ige NaCl infundiert. Nach der 12-Stunden-Infusion töteten wir den ersten Teil der Tiere, 24 Stunden später den zweiten. Den Ratten entnahmen wir Aszites und Knochenmark; Aszites zur HU-Konzentrationsbestimmung wurde unmittelbar nach der Dauerinfusion abpunktiert. Aszites zur Ermittlung der Asziteszellzahl/ml und Knochenmark zur Zellzahlbestimmung wurden wie unter 3.6. und 3.7 beschrieben beim ersten Versuchsteil unmittelbar nach Infusionsende, beim zweiten Teil 24 Stunden nach Infusionsschluß gewonnen und aufbereitet.

4.3.1. Bestimmung der zytotoxischen Wirkung 12-stündiger HU-Dauerinfusionen auf das Yoshida-Aszitessarkom

Nach der Konzentrationsbestimmung und der Auszählung der Asziteszellzahlen/ml wurde mit Hilfe des Verdünnungskoeffizienten

$$\frac{\text{Asziteszellzahl der Kontrollen nach Dauerinfusion von 0,9 \%iger NaCl bzw. 24 Stunden später}}{\text{Asziteszellzahl der Kontrollen vor der Dauerinfusion von 0,9 \%iger NaCl}}$$

der Zellwert ermittelt, der dann vorhanden wäre, wenn man die Tiere nur mit 0,9 %iger NaCl perfundiert hätte (siehe 3.6.). Subtrahiert man die unmittelbar nach der 12-Stundeninfusion bzw. 24 Stunden später gemessenen Werte von den errechneten Verdünnungswerten, erhält man eine Asziteszellzahl, die den vernichteten Zellen entspricht. Die errechneten Verdünnungswerte, die vor und gleich nach der 12-Stunden-Dauerinfusion bzw. 24 Stunden später gemessenen Zellzahlen und die Zellverluste wurden nun mit den entsprechenden HU-Asziteskonzentra-

tionen zusammengestellt. Um die Zellverluste bei den verschiedenen HU-Konzentrationen miteinander vergleichen zu können, berechneten wir die Zellverluste in Prozent:

$$\text{Zellverlust in \%} = 100 \left(1 - \frac{\text{gemessene Asziteszellzahl}}{\text{errechneter Verdünnungswert}} \right)$$

4.3.2. zytotoxische Wirkung von 12-stündigen Hydroxyharnstoff-Dauerinfusionen auf das Knochenmark

Nach der Gewinnung des Knochenmarkes aus dem Rattenfemur und nach der Zellzählung und Umrechnung auf 1 g Knochenmark (siehe 3.7.) wurde die Zellzahl/g Knochenmark und die im Aszites gemessene HU-Konzentration miteinander in Beziehung gesetzt.

4.4. PROLIFERATIONSKINETIK DES YOSHIDA-ASZITESSARKOMS NACH 12-STÜNDIGER HYDROXYHARNSTOFF-DAUERINFUSION

20 Tiere wurden am 6. Tag nach der Yoshida-Asziteßsarkomtransplantation mit 1,26 mg HU/g Körpergewicht 12 Stunden infundiert. Voraus ging ein Puls von 0,152 mg HU/g Körpergewicht. Nach der Dauerinfusion vernähten wir den Durchtrittskanal des Infusionsschlauches, um keinen Aszites zu verlieren. Unmittelbar vor der Infusion und nach Infusionsende sowie alle 2 Stunden bis zur 36. entnahmen wir 0,25 ml Aszites für die Bestimmung des H^3 -Thymidin-Markierungsindex

(siehe 3.3.1.) und des Mitose-Indexes (siehe 3.4.). H^3 -Thymidin-Markierungs- und Mitose-Index, die Parameter für Proliferationskinetik, wurden als Funktion der Zeit dargestellt.

5. ERGEBNISSE

5.1. BESTIMMUNG DER HALBWERTSZEIT

VON HYDROXYHARNSTOFF BEI YOSHIDA-ASZITESSARKOM DER RATTE

NACH EINMALIGER GABE VON 0,5 mg HU/g KÖRPERGEWICHT

Bei diesem Versuch wurden 15 Ratten verwendet. Wir bestimmten die Konzentration von Hydroxyharnstoff bis zur 6. Stunde. Der Konzentrationsabfall wurde semilogarithmisch zur Zeit aufgetragen (Abb. 1). Dabei ergab sich ein linearer Hydroxyharnstoff-Abfall proportional zur Zeit. Es wurde eine Halbwertszeit von 91 Min. ($s = 17$ Min.) gemessen.

5.2. BESTIMMUNG DER HEMMKONZENTRATION

VON HYDROXYHARNSTOFF

IM YOSHIDA-ASZITESSARKOM DER RATTE

5.2.1. nach einmaliger Gabe von

0,5 mg Hydroxyharnstoff/g Körpergewicht

Wir ermittelten von den Tieren des Versuchs 5.1. neben der Hydroxyharnstoff-Konzentration auch den H^3 -Thymidin-Markierungsindex (siehe 3.3.1.). Um festzustellen, bei welcher Konzentration Hydroxyharnstoff die Yoshida-Aszitessarkomzellen gerade noch daran hindert, in die S-Phase einzutreten, wurde der H^3 -Thymidin-Markierungsindex

mit der Eliminationskurve von Hydroxyharnstoff korreliert. Gemeinsame Abszisse war die Zeit (Abb. 2). An der Stelle, an der der H^3 -Thymidin-Markierungsindex wieder ansteigt, ist die minimale Hemmkonzentration von Hydroxyharnstoff unterschritten. Im einzelnen ergaben sich folgende Werte:

In der ersten Stunde lag der H^3 -Index im Durchschnitt bei 33 %, in der 2. Stunde sank er auf 27 %, in der 3. Stunde lag er bei 25 %, in der 4. bei 26 %. Erst dann begann die Zahl der markierten Zellen zu steigen: nach der 5. Stunde 37,4 %, in der 6. Stunde 44,6 %, in der 7. 47 %, und in der 8. Stunde 56 % H^3 -markierte Zellen. Der Anstieg des H^3 -Indexes lag also zwischen 4. und 5. Stunde, das entsprach einer Hemmkonzentration von $1,2 \cdot 10^{-3}$ mol/l Hydroxyharnstoff zur 4. Stunde und $7 \cdot 10^{-4}$ mol/l zur 5. Stunde. Die Hemmkonzentration mußte also in diesem Bereich unterschritten worden sein.

Daß der H^3 -Index nicht auf 0 % sank, lag wahrscheinlich an der Bestimmungsmethode: Es wurden nämlich die Asziteszellen nach der Entnahme 30 Min. mit TCA-Medium inkubiert. Dabei senkte sich die Hydroxyharnstoffkonzentration in der Umgebung der Zellen, so daß ein Teil der Zellen wieder dem G_1 -Block entschlüpfte. .

5.2.2. nach 12-stündigen Dauerinfusionen mit verschiedenen Hydroxyharnstoff-Konzentrationen

Bei diesem Versuch konnten 15 Tiere ausgewertet werden. Um eine genauere Hydroxyharnstoff-Hemmkonzentration für Yoshida-Aszites-sarkomzellen zu ermitteln, wurden 12-Stunden-Dauerinfusionen mit

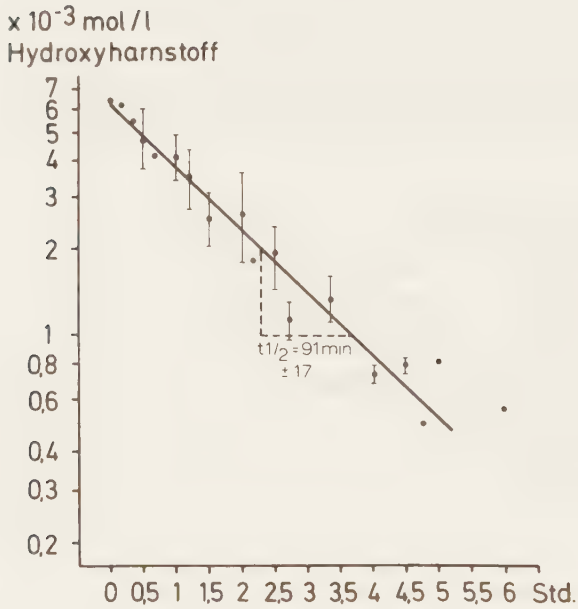


ABBILDUNG 1

Konzentrationsabfall von Hydroxyharnstoff bei Yoshida-Aszitessarkom nach einmaliger i.p.-Injektion von 0,5 mg HU/g KG.

Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von 5 - 10 Tieren mit Standardabweichung.

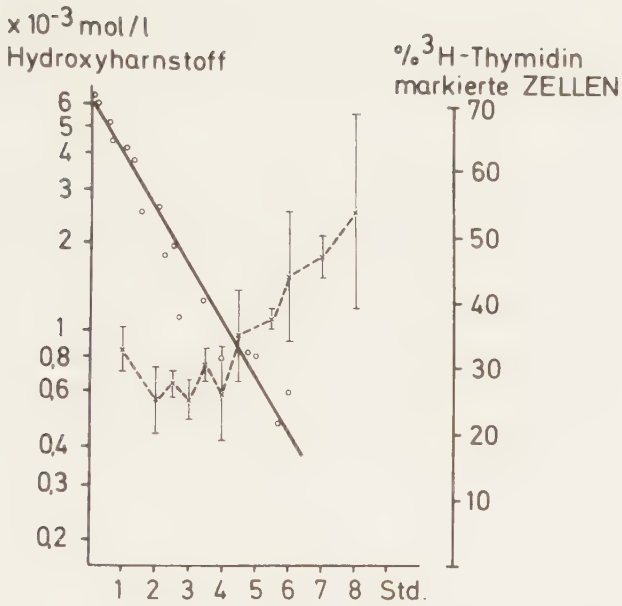


ABBILDUNG 2

Vergleich zwischen dem Hydroxyharnstoffabfall und der 3-H-Thymidin-Markierung der Yoshida-Aszitessarkomzellen nach einmaliger Gabe von 0,5 mg HU/g KG.

Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von 5 - 10 Tieren.

den unter 4.2.2. beschriebenen HU-Konzentrationen durchgeführt, danach die HU-Konzentration im Aszites gemessen, und der H^3 -Thymidin-Markierungsindex als Gradmesser für noch vorhandene DNS-Synthese bestimmt.

Dabei ergab sich eine weitgehende Hemmung der DNS-Synthese bei Konzentrationen über 10^{-3} mol/l HU. Der H^3 -Thymidin-Markierungsindex stieg nicht über 1,31 % ($s = 0,17$) (siehe Abb.3). Bei Konzentrationen unter 10^{-3} mol/l begann bereits bei einigen Zellen die DNS-Synthese wieder anzulaufen: Die Konzentration von $9,3 \cdot 10^{-4}$ mol/l zeigte eine H^3 -Markierung von 1,5 %, die Konzentrationen $7,5 \cdot 10^{-4}$ und $6,6 \cdot 10^{-4}$ mol/l wiesen eine 3 %ige Markierung auf, und bei einer Konzentration von $5,3 \cdot 10^{-4}$ mol/l betrug der H^3 -Index 8,5 %.

5.3. ZYTOTOXISCHE EFFEKTE

DURCH 12-STÜNDIGE DAUERINFUSIONEN

MIT VERSCHIEDENEN HYDROXYHARNSTOFF-KONZENTRATIONEN

5.3.1. Zytotoxische Effekte auf die

Yoshida-Aszites Sarkomzellen

Bei 19 Tieren wurde nach Dauerinfusionen mit 6 verschiedenen Konzentrationen (siehe 4.2.2.) hauptsächlich der Bereich zwischen $3,4 \cdot 10^{-3}$ und $1,1 \cdot 10^{-3}$ mol/l erfaßt, und der Zellverlust unmittelbar nach Infusionsende bzw. 24 Stunden nach Ende der Infusion bestimmt.

Die Abbildungen 4 und 6 und die Tabelle 1 zeigen die absoluten Zell-

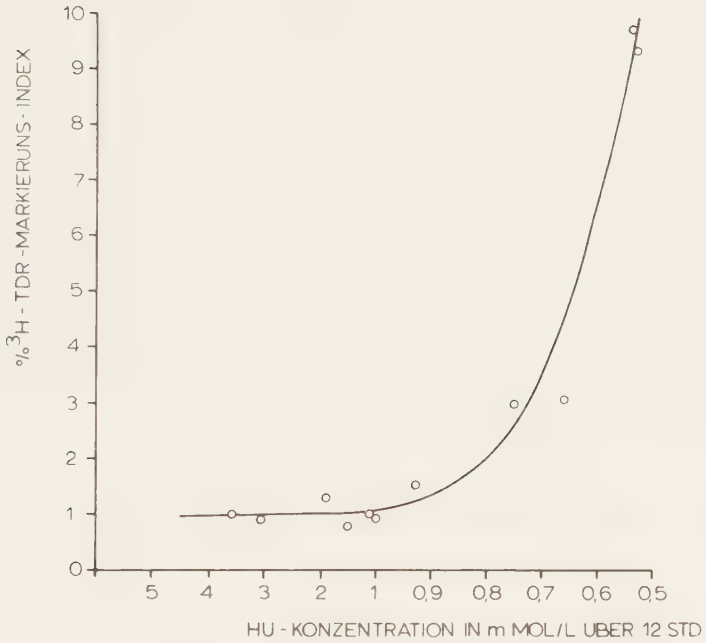


ABBILDUNG 3

Beziehung des 3-H-Thymidin-Indexes zur Hydroxyharnstoffkonzentration nach 12-Stunden-Dauerinfusion.

Jeder Punkt entspricht einem Tier.

zahlen vor und nach der Dauerinfusion und die nach dem Verdünnungskoeffizienten berechnete Verdünnung. In der Abbildung 4 sehen wir, daß über dem gesamten Konzentrationsbereich von $3,4 \cdot 10^{-3}$ bis $1,14 \cdot 10^{-3}$ mol/l Hydroxyharnstoff im Vergleich zum errechneten Verdünnungswert nach der Dauerinfusion ein Zellverlust auftrat, ausgenommen die Konzentrationen $2,25 \cdot 10^{-3}$ und $2,13 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Hier war der Verdünnungswert gleich dem gemessenen Endwert. Abbildung 6 verdeutlicht die Ergebnisse: Bei Konzentrationen über $2,25 \cdot 10^{-3}$ mol/l sind proportional zur höheren HU-Konzentration mehr Zellen zugrunde gegangen als bei Konzentrationen unter $2,13 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Bei den Konzentrationen $2,25 \cdot 10^{-3}$ und $2,13 \cdot 10^{-3}$ mol/l werden die Zellen vor der Nekrose bewahrt.

Im Abschnitt 5.2.2. konnten wir feststellen, daß bei einer Konzentration von 10^{-3} mol/l die Hydroxyharnstoff-Zellzyklusblockade vollständig ist. Der zellverschonende Effekt einer Hydroxyharnstoff-Blockade - es laufen keine Zellen in die zytotoxische S-Phase ein (Sinclair, 1967; Farber und Mitarbeiter, 1969; Dethlefsen und Mitarbeiter, 1972; u.a.) - fällt also nicht mit der minimalen Hemmkonzentration der DNS-Synthese von 10^{-3} mol/l zusammen, sondern liegt bei Konzentrationen um $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Abbildung 7 zeigt den Zellverlust, der 24 Stunden nach Infusionsende auftritt. Hier lag bei allen Konzentrationen ein Zellverlust vor; die Verlustrate war aber bei den Konzentrationen $2,68 \cdot 10^{-3}$ und $1,68 \cdot 10^{-3}$ mol/l geringer als bei benachbarten höheren oder tieferen Konzentrationen. Abbildung 6 zeigt, daß die prozentualen Zellverluste 24 Stunden nach Infusionsende den unmittelbar nach der HU-Infusion ermittelten ähneln. Bei Konzentrationen über $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l war der Zellverlust sogar niedriger als unmittelbar nach Infusionsschluß. Hier

TABELLE 1

Zusammenstellung der vor und nach dem Versuch gemessenen Asiteszellzahlen und der errechneten Verdünnungswerte

unmittelbar nach Infusionsende			24 Stunden nach Infusionsende				
Konzentration • 10^{-3} mol/l	Zellzahl /ml vor Versuch • 10^6	nach Versuch • 10^6	errechneter Verdünnungswert • 10^6	Konzentration • 10^{-3} mol/l	Zellzahl /ml vor Versuch • 10^6	nach Versuch • 10^6	errechneter Verdünnungswert • 10^6
3,4	226	97	161	7,8	280	22	106
2,69	293	66	209	3,4	288	89	109
2,45	162	63	114	2,68	165	100	113
2,25	84	60	60	1,68	149	97	102
2,13	106	88	75	1,55	164	71	104
1,89	250	150	178	1,09	196	90	135
1,14	175	165	125	0,87	56	18	25
Kontrollwerte	226 203	210 96	152	Kontrollwerte	60 152	23 105	

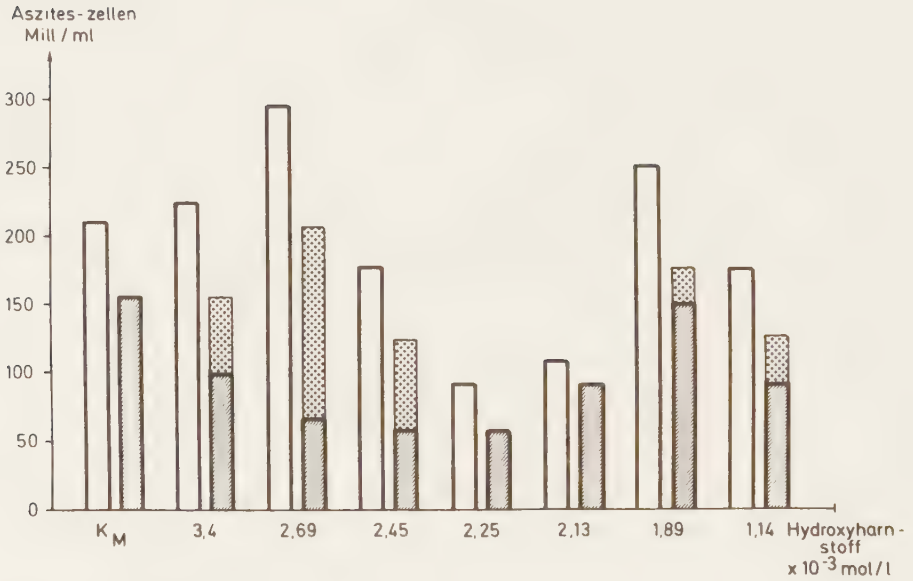


ABBILDUNG 4

Zytotoxische Effekte von 12-stündigen Hydroxyharnstoff-Infusionen mit verschiedenen Konzentrationen unmittelbar nach der Dauerinfusion.

□ Asziteszellzahl vor Dauerinfusion

▨ Asziteszellzahl nach Dauerinfusion

▤ Zellverlust bezogen auf Kontrolltiere

K_M = Mittelwert der Kontrollen

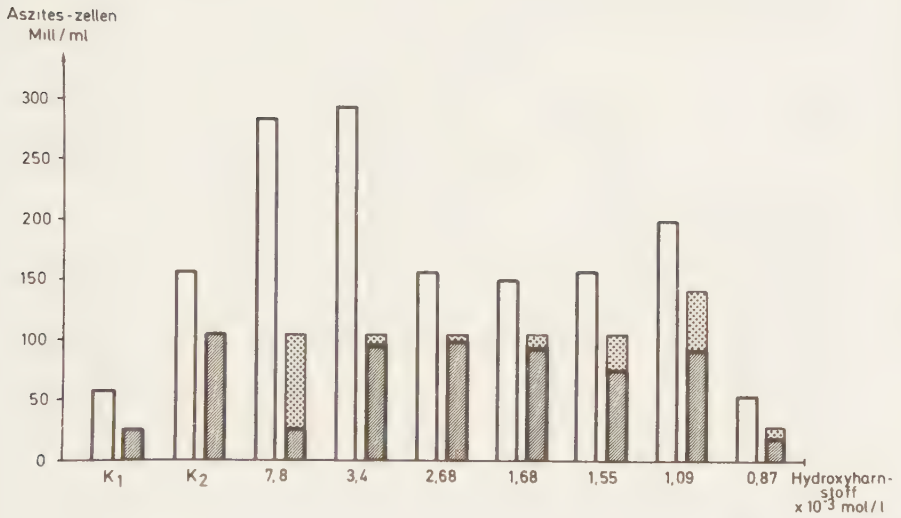


ABBILDUNG 5

Zytotoxische Effekte von 12-stündigen Hydroxyharnstoff-Infusionen mit verschiedenen Konzentrationen 24 Stunden nach der Dauerinfusion.

- ☐ Asziteszellzahl vor Dauerinfusion
 - ☒ Asziteszellzahl nach Dauerinfusion
 - ☒ Zellverlust bezogen auf Kontrolltiere
- K₁ und K₂ = Kontrollen

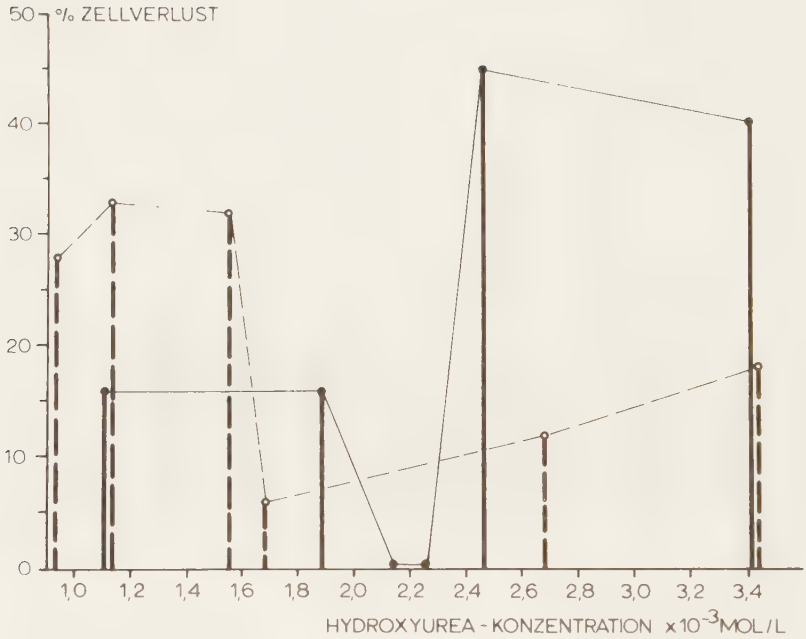


ABBILDUNG 6

Zellverlust beim Yoshida-Aszitessarkom von Wistarratten am Ende und 24 Stunden nach Ende einer intraasitären Hydroxyharnstoff-Infusion in verschiedenen Konzentrationen über 12 Stunden.

Jeder Meßpunkt entspricht dem Zellverlust in % von einem Tier unter Berücksichtigung von Zellzahl und einem Verdünnungskoeffizienten 0,9 % NaCl-infundierter Kontrolltiere.

- Zellverlust unmittelbar nach Infusionsende
- Zellverlust 24 Stunden nach Infusionsende

gehen aber unbekannte Größen wie Recruitment von Zellen aus der Ruhepause, Stimulation der Tumorwachstumsgeschwindigkeit und Repair-mechanismen mit in die Berechnung ein.

5.3.2. zytotoxische Effekte auf die Knochenmarkszellen

Da jeder der 19 Ratten neben Aszites zur Konzentrationsbestimmung und zur Zellzählung auch Knochenmark entnommen wurde, konnte das Verhältnis zwischen der Hydroxyharnstoff-Konzentration und der Zellzahl im Knochenmark aufgestellt werden (Abb. 7 und Tab. 2). Auch hier ergab sich ein verminderter Zellverlust unmittelbar nach Infusionsende bei der Konzentration $2,13 \cdot 10^{-3}$ mol/l, in der Abb. 7 erkenntlich als Anstieg der Knochenmarkszellzahl auf 221 000 Zellen/g Knochenmark. Auch 24 Stunden später war der Zellverlust in diesem Bereich geringer als bei höheren und tieferen HU-Konzentrationen: Die Zellzahl stieg bei $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol/l auf 235 000 Zellen/g Knochenmark. Die Abb. 7 zeigt außerdem, daß mit steigender HU-Konzentration die Knochenmarkszellzahl fällt: Eine höhere HU-Konzentration ist zytotoxischer. Im Bereich von ca. $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l (allerdings im Aszites gemessen) scheint also der HU-Hemmbereich zu liegen, bei dem die Knochenmarkszellen am geringsten von der zytotoxischen Wirkung des Hydroxyharnstoffs betroffen sind.

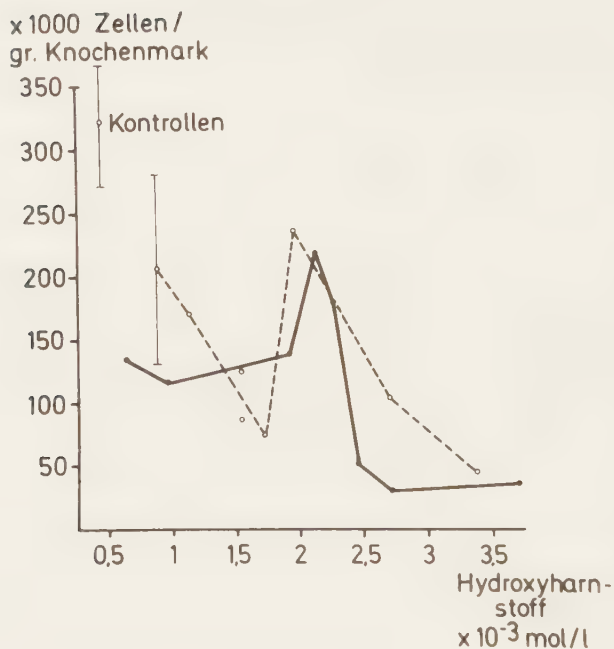


ABBILDUNG 7

Wirkung von 12-stündigen Dauerinfusionen mit verschiedenen HU-Konzentrationen auf das Knochenmark unmittelbar nach Infusionsende und 24 Stunden danach.

—•— Knochenmarkszellzahl nach Infusionsende

o---o Knochenmarkszellzahl 24 Stunden später

Jeder Punkt entspricht einer getöteten Ratte.

Ausnahme: bei $0,8 \cdot 10^{-3}$ mol/l: 3 Tiere

I Kontrollen: Mittelwert von 3 Tieren

TABELLE 2

Zusammenstellung der im Aszites gemessenen HU-Konzentrationen und der dazugehörigen Knochenmarkszellzahlen

nach Infusionsende		24 Stunden nach Infusionsende	
Konzentration · 10 ⁻³ mol/l	pro g Knochenmark	Konzentration · 10 ⁻³ mol/l	pro g Knochenmark
3,69	31 000	3,3	45 000
2,69	28 000	2,68	107 000
2,45	52 000	1,8	235 000
2,25	179 000	1,68	75 000
2,13	221 000	1,55	86 000
1,89	144 000		125 000
0,94	115 000	1,12	170 000
0,65	140 000	0,8	152 000
			170 000
Kontrollwerte		333 000,	290 000, 275 000

5.4. PROLIFERATIONSKINETIK

DES YOSHIDA-ASZITESSARKOMS

NACH EINER 12-STUNDEN-DAUERINFUSION MIT

1,428 mg HYDROXYHARNSTOFF/g KÖRPERGEWICHT

Bei diesem Versuch konnten 20 Tiere verwendet werden. Darunter waren 5 Kontrolltiere, die nur mit 0,9 %iger NaCl infundiert wurden.

Wie unter 4.4. beschrieben, bestimmten wir nach 12-stündigen Dauerinfusionen mit 1,276 mg HU/g Ratte in 2-Stundenintervallen den H³-Thymidin-Markierungs- und Mitose-Index. Die Abb.8 gibt die Mittelwerte mit Standardabweichungen von je 4-8 Tieren wieder.

Während der H^3 -Thymidin-Markierungsindex unmittelbar nach der Dauerinfusion 3,8 % und in der 2. Stunde 6,6 % betrug, stieg er nach der 2. Stunde sprunghaft an: zur 4. Stunde betrug er 32 %, zur 6. Stunde 46 %, zur 8. Stunde erreichte er seinen Höhepunkt mit 71 %. Dann erfolgte ein Abstieg der H^3 -Thymidin-Markierungskurve mit 64 % zur 10., 64 % zur 12., 45 % zur 14., 38 % zur 16., 33 % zur 18. und 16 % zur 20. und 22. Stunde. Darauf stieg der H^3 -Thymidin-Markierungsindex erneut an: Zur 24. Stunde 30 %, zur 26. Stunde 34 %. Er erreichte einen 2. Gipfel zur 28. Stunde mit 46 %, der nahe bei den Kontrollwerten lag (39 %). Anschließend sank der H^3 -Index wieder: Zur 30. Stunde betrug er 31 %, zur 32. Stunde 29 % und zur 34. Stunde 36 %.

Der Mitose-Index stieg nach der 14. Stunde steil an: Vorher lagen die Werte unter 0,8 % (vor der 8. Stunde unter 0,08 %, zur 10. Stunde 0,5 %, zur 12. Stunde 0,7 %). Seinen ersten Gipfel erreichte er zur 22. Stunde mit 6 %. Er fiel dann wieder auf 2,4 % zur 28., 30. und 32. Stunde. Ein kleiner zweiter Gipfel des Mitoseindex mit 3 % zeigte sich zur 34. Stunde nach Abschluß der HU-Dauerinfusion. Die Mitosen-Kontrollwerte lagen bei 2 %.

Vergleichen wir den H^3 -Index der Kontrolltiere mit dem der HU behandelten Tiere, so zeigt sich, daß der Synchronisationsgrad zur 8. Stunde das 2,1-fache der Kontrollen erreichte. Der 2. Peak der H^3 -Kurve lag schon im Bereich der Kontrollwerte. Der Vergleich zwischen dem Mitose-Index der HU behandelten Tiere und dem der Kontrollen ergab, daß nach der 12-Stunden-HU-Blockade dreimal soviel Zellen in die Mitose eintraten. Der 2. Mitosegipfel stieg ebenfalls nicht signifikant über die Kontrollwerte hinaus.

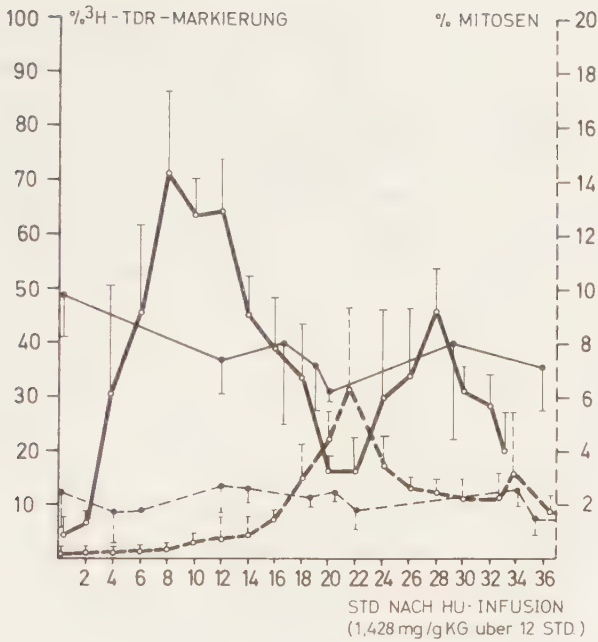


ABBILDUNG 8

H^3 -Thymin- (kräftig durchgezogene Linie) und Mitoseindex (kräftig gestrichelte Linie) nach 12 Stunden-Dauerinfusion mit 1,428 mg HU/g bei Yoshida-Aszitessarkom.

Schwach durchgezogene Linie: Kontrolltiere für H^3 -Index.

Schwach gestrichelte Linie: Kontrolltiere für Mitosen.



Standardabweichungen des H^3 -Thymin-Markierungsindex



Standardabweichungen des Mitose-Indexes

Die Generationszeit, gemessen am Abstand beider Peaks des H^3 -Thymin-Markierungsindex, betrug 19 Stunden, die S-Phasendauer ca. 7 Stunden (gemessen am auf- und absteigenden Schenkel des ersten Peaks des H^3 -Thymin-Markierungsindex bei 50 % des Maximalwertes). Die von uns gemessene Generationszeit (T_c) entspricht somit der bekannten, durch die Markierte-Mitose-Kurve ermittelten Generationszeit. Die von uns ermittelte S-Phasendauer stellte sich gegenüber dem bekannten Wert von $S = 9$ Std. verkürzt dar (Kurita und Mitarbeiter, 1964).

6. DISKUSSION

Für die Tumorforschung ist es unerlässlich, sich auf geeignete Beispiele aus dem Tier- und Pflanzenreich zu stützen, um die Ursachen des unkontrollierten Wachstums zu ergründen, und um geeignete Mittel zu finden, die Tumoren zu bekämpfen. Das Arbeiten mit diesen Tumoren hat deshalb Modellcharakter.

Das Yoshida-Aszitessarkom ist wegen seiner kurzen Generationszeit, seiner großen Wachstumsfraktion und seiner relativ homogenen Zellpopulation für proliferationskinetische Studien und Untersuchungen über Zytostatikawirkungen geeignet. Die growth fraction beträgt nach eigenen Untersuchungen 93 %. Die Generationszeit ist 19 Stunden (Kurita und Mitarbeiter, 1964; Lennartz und Mitarbeiter, 1968). Sie ist also im Vergleich zu anderen Tumoren kurz (Lennartz und Mitarbeiter, 1968; Klein und Mitarbeiter, 1970; Klein und Mitarbeiter, 1972; Steel, 1972).

Wir untersuchten die Wirkung von Hydroxyharnstoff auf das Yoshida-Aszitessarkom. HU, das von Dresler und Stein (1869) erstmalig synthetisiert wurde, ist ein DNS-Inhibitor (Sinclair, 1965; Pfeiffer und Mitarbeiter, 1967; Sinclair, 1967; Young und Mitarbeiter, 1967; Yarbo, 1968; Farber und Mitarbeiter, 1969; Piver und Mitarbeiter, 1972). HU wird zum größten Teil in der Leber zu Harnstoff umgebaut (Adamson und Mitarbeiter, 1965; Colvin und Mitarbeiter, 1970). Die Halbwertszeit von HU im Plasma oder im Blut muß deshalb eine Funktion der Leber sein. Rajewsky und Mitarbeiter (1971) ermittelten im Blut von Marshall-Ratten bei einer Dosis von 0,25 mg Hydroxyharnstoff/g Körpergewicht eine Halbwertszeit von 21 Min. In der Leber ist die Abbaurate so groß, daß bei einer HU-Zufuhr von 0,5 mg/g Körperge-

wicht nach einer Stunde nichts mehr nachweisbar ist. Bei größeren Mengen wird die Leistungskapazität der Leber bei weitem überschritten, und deshalb die Halbwertszeit verlängert. Bei 46 mg HU/kg Körpergewicht beträgt die Halbwertszeit im Plasma der männlichen Sprague-Dawley-Ratte ca. 30 Min., bei einer Menge von 1840 mg/kg 70 Min. (Philips und Mitarbeiter, 1967). Da HU als Inhibitor in die DNS-Synthese eingreift, ist es verständlich, daß HU in sich schnell teilenden Geweben mit einer hohen growth-fraction vermehrt angereichert, oder, umgekehrt, vermindert an das Plasma abgegeben wird. Deswegen ist eine Halbwertszeit von 91 Min. im Aszites-Yoshida-Sarkom möglich, die im Vergleich zur Halbwertszeit im Blut (25 Min.) (Rajewsky und Mitarbeiter, 1971) sehr hoch erscheint. Betroffen von der HU-Anreicherung sind sicher auch sich schnell teilende Gewebe, wie das myeloische, das erythropoietische System oder germinatives Gewebe, bei denen die langsamere Elimination von HU eine längere DNS-Blockade und bei höherer Konzentration eine Zerstörung der Zellen erwarten läßt (Phillips und Mitarbeiter, 1967; Kennedy, 1970; Morse und Mitarbeiter, 1970; Rickard und Mitarbeiter, 1970).

Die durch 12-stündige Dauerinfusionen ermittelte minimale DNS-Hemmkonzentration, bei der nur noch 1,5 % der Zellen dem G_1 S-Block entläßt, beträgt bei Yoshida-Aszitessarkom 10^{-3} mol/l. Ähnlich hohe Werte wurden auch von anderen Autoren ermittelt: Im Lungengewebe von China-Hamstern hatte eine Konzentration von 10^{-5} mol/l HU bei In-Vitro-Versuchen keine Hemmwirkung, erst eine Konzentration von 10^{-3} mol/l Hydroxyharnstoff konnte die DNS-Synthese effektiv hemmen (Sinclair, 1967). Yarbo (1968) fand in Mäuseasziteszellen bei einer HU-Konzentration von $1,3 \cdot 10^{-2}$ mol/l eine 5 %ige DNS-Synthese. Hela-Kulturen boten bei HU-Konzentrationen von 10^{-2} mol/l einen H^3 -Thymidin-Markierungsindex von 3 - 5 % (Pfeiffer und Mitar-

beiter, 1967; Young und Mitarbeiter, 1967). Andererseits gibt es auch Tumoren und Gewebe, die sensibler auf Hydroxyharnstoff reagieren: So ermittelten Rajewsky und Mitarbeiter (1971) beim BICR/MICR-Tumor der Ratte eine HU-Hemmkonzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ mol/1000 g. Das Foetalgewebe von Rattenembryonen wurde bei einer HU-Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ mol/1000 g gehemmt. Dies zeigt also, daß die einzelnen Tiergattungen, aber auch die verschiedenen Gewebe einer Tierart unterschiedlich auf Hydroxyharnstoff reagieren. Während die Berichte über Hemmkonzentrationen von Hydroxyharnstoff in den verschiedenen Geweben und Tumoren noch lückenhaft sind, gibt es viele Belege für die zytotoxische Wirkung von HU auf sich schnell teilende Gewebe: So wurde über eine hochgradige Schädigung von Dünndarm und Kolon mit blutigem Aszites bei Ratten durch die Gabe von 1840 mg HU/kg Körpergewicht berichtet (Philips und Mitarbeiter, 1967). Auch Dethlefsen und Mitarbeiter (1973) schreiben von schweren Schäden an Dünndarmzellen durch Hydroxyharnstoff bei C3H Mäusen. Rajewsky und Mitarbeiter (1971) berichten von einer hochgradigen Schädigung der kleinen Lymphozyten bei Ratten.

Mit höherer HU-Konzentration steigt auch der zytotoxische Effekt (Sinclair, 1965; Farber und Mitarbeiter, 1969; Mauro und Mitarbeiter, 1969; Rajewsky und Mitarbeiter, 1971; Piver und Mitarbeiter, 1972), weil Zellen, die sich gerade in der S-Phase befinden durch die hohe HU-Konzentration vulnerabler sind (Mauro und Mitarbeiter, 1969; Piver und Mitarbeiter, 1972; Dethlefsen und Mitarbeiter, 1976). Ähnlich sind die zytotoxischen Effekte nach den 12-stündigen Hydroxyharnstoff-Infusionen auf die Yoshida-Asziteszellen zu erklären. Hier wird mit steigender HU-Konzentration der Zellverlust immer größer. Die Ausnahmen bilden die Konzentrationen von $2,25 \cdot 10^{-3}$ und $2,13 \cdot 10^{-3}$ mol/l HU. Hier sinkt der Zellverlust auf ein Minimum ab. Ein Zeichen dafür, daß die Hydroxyharnstoff-Blockade der Tumorzellen optimal ist. Nur geringfügig gelangen noch Zellen in die S-Phase. Dadurch wird der

Zellverlust weitgehend reduziert. Bei niedrigeren Konzentrationen entschlüpfen immer wieder Zellen dem G_1 S-Block und werden in der S-Phase von Hydroxyharnstoff letal getroffen. Auch 24 Stunden nach dem 12-stündigen Dauerblock liegt bei $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l HU ein geringerer Zellverlust vor als bei höheren und niedrigeren Konzentrationen. Die schnell abflutende HU-Menge (Sinclair, 1967; Rajewsky und Mitarbeiter, 1971; Sauer und Mitarbeiter, 1976) scheint nach Aufhebung der Blockade keine größeren zytotoxischen Schäden mehr zu setzen. Analog verlaufen die Vorgänge im Knochenmark der Ratte: Auch hier sehen wir bei einer Konzentration von ca. $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l HU im Aszites sowohl unmittelbar nach Infusionsende, wie auch 24 Stunden später, eine vermehrte Anzahl überlebender Zellen. Auch hier blockiert Hydroxyharnstoff die Knochenmarkszellen optimal. Bei höheren Konzentrationen überwiegt wiederum der zytotoxische Effekt, bei niedrigeren entschlüpfen immer wieder Zellen dem G_1 S-Block und werden letal getroffen. Viele Autoren berichten über zytotoxische Effekte auf das Knochenmark nach Gabe von Hydroxyharnstoff (Kennedy, 1970; Morse und Mitarbeiter, 1970; Rickard und Mitarbeiter, 1970; Haas und Mitarbeiter, 1971; u. a.). Besonders anfällig gegenüber Hydroxyharnstoff scheinen die Stammzellen zu sein, dann folgen Myeloblasten und Erythroblasten. Interessant ist auch die Beobachtung von Haas und Mitarbeitern (1971), daß eine einmalige Gabe einer hohen Dosis von HU die Knochenmarkszellen weniger schädigt, als die fraktionierte Gabe derselben Gesamtmenge. Hier fällt bei fraktionierter HU-Gabe die Hydroxyharnstoff-Konzentration immer wieder unter die Hemmschwelle, und Zellen, die sonst durch den G_1 S-Block geschützt wären, gelangen in die S-Phase, in der sie tödlich getroffen werden. Dieses Beispiel zeigt, wie wichtig eine vollständige Blockade zur optimalen Zellsynchronisation mit geringster Zellschädigung ist.

Verfolgt man den Zellzyklus mit dem H^3 -Thymidin-Markierungsindex als Parameter für DNS-Synthese und dem Mitose-Index als Gradmesser der proliferativen Kapazität nach einer 12-stündigen Dauerinfusion mit einer HU-Menge von 1,428 mg pro g Körpergewicht, müßte man annehmen, daß ein hoher Synchronisationsgrad erreicht würde. Denn 1. ist die Hemmzeit länger als die Differenz von Generationszeit und DNS-Synthesezeit (Generationszeit = 19 Stunden, DNS-Synthesezeit = 9 Stunden), so daß sich während dieser 12 Stunden alle Zellen im G_1 -S-Block ansammeln müßten, und 2. ist die Hemmung der DNS-Synthese durch die hohe HU-Infusionsdosis vollständig. Es wird aber nur eine H^3 -Thymidin-Markierung von 71 % zur 8. Stunde erreicht, das 2,1-fache der Kontrollwerte. Mit einer einmaligen Gabe von 0,5 mg HU/g Körpergewicht erreicht man schon einen Markierungsindex von 65 %, das 1,5-fache der Kontrollwerte (Hartenstein und Mitarbeiter, 1975). Erklärbar ist der zu geringe Unterschied nach einmaliger und nach Langzeitgabe von Hydroxyharnstoff folgendermaßen: Durch die enorme HU-Zufuhr von 1,428 mg/g Körpergewicht ist der zytotoxische Effekt doch so massiv, daß Asziteszellen nicht mehr synthesefähig sind, aber noch nicht der Nekrose oder Lyse anheimfallen und als nicht DNA bildende Zellen bei der H^3 -Thymidin-Markierungsindex-Bestimmung mit in die Zählung eingehen. Eine Verkürzung der DNS-Synthesephase, wie bei unserer Untersuchung gemessen, deutet auf einen schnelleren Ablauf der DNS-Synthese der Tumorzellen nach HU-Applikation hin. Sie könnte als Wachstumsstimulation nach Zellverlust durch zytotoxische Einflüsse gedeutet werden. Über eine derartige Verkürzung der DNS-Synthesezeit nach temporärer Hemmung durch HU bei in-vivo-Untersuchungen (Sinclair, 1967; Rajewsky und Mitarbeiter, 1971; u. a.) und bei einigen Zellstämmen in Kultur ist schon früher berichtet worden (Rueckert und Mitarbeiter, 1960; Till und Mitarbeiter, 1963; Pfeiffer und Mitarbeiter, 1967; u. a.).

Der verzögerte Abfall der H^3 -Thymidinmarkierung könnte durch Subpopulationen entstehen, die sich in der G_2 -Phase voneinander unterscheiden (Lennartz, 1968; Steel, 1972).

Der Mitoseindex beträgt nach der Dauerinfusion maximal 6 %, im Gegensatz zum Mitoseindex nach Einmalpuls mit 2 % (Hartenstein und Mitarbeiter, 1975). Nach der Dauerinfusion sind also über dreimal mehr Zellen in die Mitosephase gelangt. Da nach Dauerinfusion ein H^3 -Index von 71 % gemessen wurde, nach Einmalpuls 65 % (Hartenstein und Mitarbeiter, 1975), aber dreimal mehr Zellen in die Mitose eintreten als nach einmaliger HU-Gabe, könnte man annehmen, daß bei Einmalpuls mit 0,5 mg HU/g Körpergewicht durch den unvollständigen G_1 S-Block laufend Zellen in die S-Phase rutschen. Sie werden zwar durch die HU-Konzentration so stark getroffen, daß sie die nächste Mitose nicht mehr mitmachen können, sind aber noch fähig, DNS zu synthetisieren. Dethlefsen und Mitarbeiter (1973) berichten über diesen Effekt bei Zellen von Dünndarmkrypten. Auch Sinclair (1967) beschreibt Zellen, die nach der Hydroxyharnstoff-Blockade noch DNS synthetisieren können, 24 Stunden später aber der Lyse anheimfallen. So könnte man sich den hohen H^3 -Thymidin-Markierungsindex bei HU-Einmalpuls erklären. Dagegen garantiert die lange HU-Zufuhr durch die 12-Stunden-Infusion länger in G_1 S aufgestaute Zellen. Der Bruchteil von Zellen, die noch in die S-Phase einlaufen, wird durch die hohe HU-Konzentration zwischenzeitlich letal getroffen und ist nicht mehr zur DNS-Synthese fähig. Nach dem Aufheben der G_1 S-Blockade nehmen also nur Zellen H^3 -Thymidin auf, die dann auch in die Mitosephase gelangen. Dies zur Erklärung des dreimal höheren Mitosegipfels nach 12-stündiger Dauerinfusion mit Hydroxyharnstoff.

Der H^3 -Thymidin-Markierungsindex hat seinen 2. Gipfel zur 28. Stunde

mit 46 %. Dieser Wert ist gegenüber den Kontrollwerten (39 %) nicht signifikant erhöht. Hier zeigt sich die zunehmende Desynchronisation des Tumors im Laufe eines Generationszyklus.

Daß Hydroxyharnstoff als Synchronisationsmittel für eine Kombinations-therapie geeignet ist, zeigen folgende Beispiele: HU-Verabreichung vor Gabe des G_2 - und Mitosephase-spezifischen Bleomycins zeigt einen größeren therapeutischen Effekt bei der Behandlung von Ratten-Yoshida-Sarkom als die gleichzeitige Gabe beider Medikamente (Hartenstein und Mitarbeiter, 1975). Mäuse-Lymphomzellen werden empfindlicher gegenüber G_1 S- und mitose-phasespezifischen Röntgenstrahlen, wenn sie zuvor mit Hydroxyharnstoff behandelt wurden (Mauro und Mitarbeiter, 1969). Piver und Mitarbeiter (1972) berichten über Erfolge bei der Behandlung des CH3-Mammatumors der Maus durch Synchronisation mit HU und anschließender Bestrahlung. Auch beim Menschen wirkt sich eine Kombinationstherapie mit Hydroxyharnstoff als Synchronisationsmittel und Cytosinarabinosid als zytozides Therapeutikum erfolgreich bei der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie aus (Sauer und Mitarbeiter, 1976).

Die Effektivität einer solchen Behandlung ließe sich steigern, wenn man für den zu behandelnden Tumor die optimale Blockadekonzentration von Hydroxyharnstoff bestimmen könnte, bei der Tumor und physiologisches Gewebe zwar gehemmt, aber nicht durch das Mittel vernichtet würden. Unter der Voraussetzung, daß Tumor und physiologisches Gewebe unterschiedliche Generationszeiten haben, und die Generationszeiten auch bekannt sind, könnte der zweite, zytozide Therapieschritt zeitlich so gelegt werden, daß die Tumorzellen getroffen werden, das physiologische Gewebe aber weitgehend geschont wird.

Neben Hydroxyharnstoff kommen zur Synchronisation auch andere Medikamente wie Vincristin oder Fluorouracil zur Anwendung (Nitze und Mitarbeiter, 1968; Klein und Mitarbeiter, 1970; Nitze und Mitarbeiter, 1971; Gremmel, 1972; Nitze und Mitarbeiter, 1972; Drings, 1975; u. a.).

Doch sind der Synchronisationstherapie allgemein Schranken gesetzt: Geringe Wachstumsfraktion und mehrere Zellpopulationen mit verschiedenen Generationszeiten innerhalb eines Tumors schränken den Erfolg einer wirkungsvollen Synchronisationsbehandlung ein. Zu lange Generationszeiten der Tumoren lassen deren Synchronisation fraglich erscheinen, weil durch die notwendige lange Einwirkung des Zellblockers schneller proliferierendes Gewebe stärker getroffen wird als der Tumor selbst, und eine erhebliche Beeinträchtigung der proliferativen Kapazität aller proliferierenden Gewebe die Folge ist. Daraus folgt, daß sinnvolle Synchronisationstherapie nur möglich scheint, wenn

1. die Generationszeit des Tumors kurz ist,
2. der Tumor keine Subpopulationen mit verschiedenen Generationszeiten hat,
3. der Tumor eine hohe Wachstumsfraktion besitzt, und
4. die Generationszeiten der Wechselgewebe bekannt sind.

Viele dieser Daten für eine effektive und optimale Synchronisationstherapie sind zur Zeit nur in Ausnahmefällen zu beschaffen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Mit einer einmaligen Gabe von 0,5 mg Hydroxyharnstoff/g Körpergewicht wurde die Halbwertszeit von Hydroxyharnstoff im Yoshida-Aszitesarkom der Ratte bestimmt. Sie lag bei 91 Minuten ($s = \pm 17$ Min.). Durch Einmalpuls mit 0,5 mg Hydroxyharnstoff/g Körpergewicht wurde die minimale DNS-Hemmkonzentration von Yoshida-Aszitesarkomzellen durch Hydroxyharnstoff in einem Bereich von $0,7 \cdot 10^{-3}$ mol/l bis $1,2 \cdot 10^{-3}$ mol/l ermittelt. 12-stündige intraperitoneale Infusionen von Hydroxyharnstoff zur genaueren Festlegung der minimalen DNS-Hemmkonzentration ergaben einen Wert von 10^{-3} mol/l Hydroxyharnstoff im Aszites.

Bei der Untersuchung der zytotoxischen Effekte auf die Aszitestumorzellen und das Knochenmark war der Zellverlust bei den Konzentrationen $2,25 \cdot 10^{-3}$ und $2,13 \cdot 10^{-3}$ mol/l Hydroxyharnstoff im Aszites geringer als bei höheren und tieferen Konzentrationen. In diesem Bereich liegt die optimale Zell-Hemmkonzentration durch Hydroxyharnstoff, bei dem die blockierende Wirkung stärker ist als seine zytotoxische. Auch 24 Stunden nach Beendigung der Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion wurden in diesem Konzentrationsbereich geringere Zellverluste als bei höheren oder niedrigeren Konzentrationen registriert.

Durch eine 12-stündige intraaszitäre Dauerinfusion mit 1,428 mg Hydroxyharnstoff/g Ratte konnte eine Tumorzellsynchronisation nach Blockierung der Yoshida-Aszitesarkomzellen am Übergang der präsynthetischen zur DNS-Synthesephase über einen gesamten Zellgenerationszyklus, kenntlich an zwei hintereinander auftretenden Peaks DNS-synthetisierender Zellen, nachgewiesen werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMSON R., AGUE S., DAVISON J.:
The Distribution, Excretion and Metabolism of
Hydroxyurea- C^{14}
Pharmacol. Exptl. Therapeutics 150, 322-327 (1965)
- BLOOMFIELD C.I., BRUNNING D.R., THEOLOGIDES A.,
KENNEDY B.J.: Daunorubicin-Prednisone Remission Induction
With Hydroxyurea Maintenance In Acute Non Lym-
phocytic Leukemia
Cancer, Vol. 31, 931-938 (1973)
- BLUMENTHAL L., ZAHLER St.:
Index For Synchronisation Of Cell Populations
Science 135, 724 (1961)
- COLVIN, BONO: The Enzymatic reduction of HU To Urea By Mouse
Liver
Cancer Res. 30, 1516-1519 (1970)
- DANIEL F.: Praktische Dermatologie, S. 132-133
BYK-Essex, 1976
- DETHLEFSEN A., LYLE, PILEY M.R.:
Hydroxyurea Effects In The C3H Mouse
Cel. Tiss. Kin. 6, 173-184 (1973)
- DRESLER und STEIN: Über den Hydroxyharnstoff
Ann. Chim. 150, 242-252 (1869)
- DRINGS P.: Chemotherapie maligner Tumoren
Therapiewoche 8, 875-889 (1975)
- FABRICIUS E., RAJEWSKY M.F.:
Determination of Hydroxyurea In Mammalian
Tissues And Blood
Biol. Res. 16, 679-684 (1971)
- FARBER E., BASERGA R.:
Differential Effects Of Hydroxyurea On Survival
Of Proliferating Cells In Vivo
Cancer Res. 29, 136-139 (1969)

- GERIKE D.: Methoden zur Testung von Substanzen auf zytostatische Wirksamkeit.
Münch. Med. Wschr. 115, 18, 833-838 (1973)
- GILLETTE E.L., WITHERS H.R., TANNOCK J.F.: The Age Sensivity Of Epithelial Cells Of Mouse Small Intestine
Radiology 96, 639-643 (1970)
- GRANZOW C., GRANZOW V.: Eine Fehlerquelle bei Synchronisationsversuchen mit malignen Tumoren in vivo
Z. Krebsforschung 81, 15-22 (1974)
- GREMMEL C., QUÄCK J.: Zum Problem der Synchronisation von Tumorzellen bei kombinierter Zytostatika- und Strahlentherapie
Strahlentherapie 144, 135-139 (1972)
- HAAS R.J., FACHE L., BOHNE F., FLIEDNERT M.: Die Wirkung von Hydroxyharnstoff auf die Hämostase der Ratte nach einmaliger oder fraktionierter Gabe
Arzneim.-Forschung 21, 7, 974-978 (1971)
- HARTENSTEIN R., EHRHART H., HOFFMAN K.: Zellkinetische Untersuchungen beim Ehrlich-Aszites-Tumor unter Vinkristin
Z. Krebsforschung 79, 213-220 (1973)
- HARTENSTEIN R., POSSINGER K., EHRHART H.: Tierexperimentelle Untersuchungen über die konsekutive Kombinationstherapie mit Bleomycin
Hrsg.: W. Williams, Bleomycin 1975
Verlag Ahnen - Laupheim, S. 95-97
- HARTENSTEIN R., POSSINGER K., PFUNDMAIR C., EHRHART H.: Vergleichende Untersuchungen mit Hydroxyharnstoff und Vinkristin an Tiertumoren
In: Hartwich G.,
peri-med-Verlag, Erlangen 51 (1976)

- HUNSTEIN W., REHN K. :
Tumorinduktion durch Zytostatika beim Menschen.
Dtsch.med. Wschr. 100, 155-158 (1975)
- KENNEDY B.J. :
Cyclic Leukocyte Oscillations In Chronic Myelogenous Leukemia During Hydroxyurea Therapy
Blood, Vol. 35, 6, 751-760 (1970)
- KEPP, STEMMLER: Lehrbuch der Gynäkologie, S. 333-335
Thieme Verlag, 1971
- KLEIN H.O., LENNARTZ K.J., EDER M.; FISCHER R. :
In vivo- und in vitro Untersuchungen zur Zellkinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen
Dtsch.med. Wschr. 97, 1273-1282 (1972)
- KLEIN H.O., LENNARTZ K.J., HABICHT W., EDER M., GROSS R. :
Synchronisation von Ehrlich-Aszites Tumorzellen und ihre Bedeutung bei der Anwendung eines alkylierenden Zytostatikums
Klin. Wschr. 48, 1001-1005 (1970)
- KLEIN H.O., LENNARTZ K.J. :
In vitro-Untersuchung zur Proliferationskinetik von Erythroblasten, myeloischen Vorstufen und Tumorzellen des Menschen
Med. Welt 21/43, 1853-1855 (1970)
- KRAKOFF I.H., BROWN N.C., REICHARD P. :
Inhibition Of Ribonucleoside Diphosphate Reductase By Hydroxyurea
Cancer Res. 28, 1559-1563 (1968)
- KURITA Y., MORIWAKI K., YOSHIDA T.H. :
Autoradiographic Analysis of The Mitotic Cycle In Yoshida Sarkoma Cells
Gann 55, 397-402 (1964)
- KUSCHINSKY G., LÜLLMANN H. :
Pharmakologie, S. 268-274
Thieme Verlag, 1972
- LENNARTZ K.J. :
Proliferationskinetik von Tumorzellen.
Aus Fortschritte der Krebsforschung, S. 333-350
Schattauer-Verlag, Stuttgart - New York, (1968)

- LENNARTZ K.J., KLEIN H.O., LACROIX W., KLEIN P.J. :
Vergleichende in vivo- und in vitro-Untersuchung
der Zellkinetik experimenteller Tumoren und die
Bestimmung des Generationszyklus von Tumor-
zellen des Menschen in vitro
Path. 55, 591-597 (1971)
- MAIDHOF R., JELLINGHAUS W., SCHULTZE B., MAURER W. :
Experimentelle und theoretische Untersuchungen
zur Erzeugung einer teilsynchronen proliferieren-
den Zellpopulation mit Vinkristin in vivo
Dtsch.med. Wschr. 100, 54-56 (1975)
- MAURER-SCHULTZE B. :
Methoden zur Zellzyklusanalyse bei Tumoren
in Wüst: Aktuelle Probleme der Therapie malign-
er Tumoren, S.155-167
Thieme Verlag 1973
- MAURO F., MADOC-JONES W. :
Age Response To Y-Radiation Of Murine Lym-
phoma Cells Synchronized In Vivo
Vol. 63, 686-691 (1969)
- MORSE B., RENCRICCA N., STOHLMAN F. :
Relationship Of Erythropoietin Effectivness To
The Generative Cycle Of Erythroid Precursor
Cell
Blood, Vol. 35, 6761-6773 (1970)
- MÜLLER D., REICHERT E., LANG H.D., ORVWALL D. :
Zellzyklusänderungen und ineffektive Zellneubil-
dung bei gestörter Granulo- und Erythropoiese
Klin. Wschr., April 1974, 384-393
- NIAS A.H.W., FOX M. :
Synchronization Of Mammalian Cells With Res-
pect To The Mitotic Cycles
Cell. Tissue Kin. 4, 375-398 (1971)
- NITZE H.R., ROSEMAN G. :
Kombinierte Invivo-Invitro Untersuchungen zur
Synchronisation menschlicher Tumoren
Aus: Fortschritte der Krebsforschung, S.187-190
Schattauer-Verlag, Stuttgart - New York (1968)

NITZE H.R., GANZER U., VOSTEEN K.-H.:

Synchronisationstherapie als neues Prinzip in
der Tumorbehandlung
Dtsch. Ärzteblatt 21, 1702-1704 (1971)

NITZE H.R., GANZER U., VOSTEEN K.-H.:

Die Strahlenbehandlung maligner Tumoren nach
Synchronisation des Zellteilungsrythmus
Strahlentherapie 143, 329-337 (1972)

PFEIFFER S.E., TOLMACH L.J.:

Inhibition Of DNA-Synthesis In HeLa Cells By
Hydroxyurea
Cancer Res. 27, 124-129 (1967)

PHILIPS F.P., STERNBERG S., SCHWARZT H., CRONIN A.:

SONDERGREN J., VIDAL P.:

Acute Cell Death In Proliferating Tissues In Rats
Cancer Res. 27, 61-69 (1967)

PILGRIM Ch., LENNARTZ K.J., WEGENER K., HOLLWEG S.,

MAURER W.:

Autoradiographische Untersuchung über tages-
zeitliche Schwankungen des H-3-Indexes und des
Mitose-Indexes bei Zellarten der ausgewachsenen
Maus, des Rattenfetus, sowie bei Aszitestumor-
zellen
Z. Zellforschung 68, 138-154 (1965)

PIVER St., HOWES A., SUIT H., MARSHALL N.:

Effect Of Hydroxyurea On The Radiation Response
Of C3H Mouse Mammary Tumors
Cancer, Vol. 29, 407-412 (1972)

RABES H., JANTSCH B.:

Kombination von Kurzzeitinkubation und Lanzeit-
kultur beim Cytostatica-Test menschlicher Tu-
morzellen
Z. Krebsforschung 74, 295-303 (1970)

RAJEWSKY M.F., HÜLSER D.F., FABRICIUS E.:

Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Tem-
poräre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydro-
xyharnstoff in normalen und malignen Säugerzell-
systemen
Z. Krebsforschung 76, 266-292 (1971)

- RICKARD K. A., SHADDUGK R. K., HOWARD D. E., STOHLMAN F. :
A Differential Effect of Hydroxyurea on Hemopoietic Stem Cell Colonies In Vitro And In Vivo
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 134, 152-156 (1970)
- ROSNER F., RUBIN H., PARISE F. :
Studies On The Absorption, Distribution And Excretion Of Hydroxyurea
Canc. Chemotherapy Reports Part 1, Vol. 55, 2, 167-173 (1971)
- RUECKERT Rr., MUELLER Gc. :
Studies On Unbalanced Growth In Tissue Cultur.
I. Induction And Consequences Of Thymidin Definicity
Canc. Res. 20, 1584-1589 (1960)
- SAUER H., WILMANNS W. :
Derzeitiger Stand der Synchronisationstherapie von malignen Tumoren und akuten Leukämien
Klin. Wschr. 54, 197-209 (1976)
- SAUER H., PELKA R., WILMANNS W. :
Zur Pharmakokinetik von Hydroxyharnstoff und seine Anwendung bei der Therapie von akuten myeloischen Leukämien unter Ausnutzung von Synchronisations- und Recruitmenteffekten
Klin. Wschr. 54, 203-208 (1976)
- SCHNEIDER R. :
Beitrag zur Wirkungsweise einiger Zytostatika und ionisierender Strahlen
Strahlentherapie 126, 213-262 (1965)
- SCHULTZE B. :
Orthologie und Pathologie des Nukleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm
Habilitationsschrift Würzburg 1967
- SINCLAIR W. K. :
Hydroxyurea: Differential Lethal Effects On Cultured Mammalian Cells During The Cell Cycle
Science 24, 1729-1731 (1965)
- SINCLAIR W. K. :
Hydroxyurea: Effects On Chinese Hamster Cells Grown In Culture
Canc. Res. 27, Part 1, 297-308 (1967)

- STEEL G. : The Cell Cycle In Tumours; An Examination Of Data Gained By The Technique Of Labelled Mitoses Cell Tissue Kinet. 5, 87-100 (1972)
- STEIGLEDER G. K. : Dermatologie und Venerologie, S. 443-447 Thieme-Verlag, 1972
- TILL J. E., WHITEMORE G. F., GULGUYAS S. : Deoxyribonucleic Acid Synthesis In Individual L-Strain Mouse Cells. II. Effects Of Thymidin Starvation Biochim. Biophys. Acta 72, 277-389 (1963)
- WITTMANN K. : Bestimmung der DNS-Synthesedauer von Lymphdrüsenzellen bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie durch Doppelmarkierung mit ^3H -Thymidin und ^{14}C -Thymidin in vivo. Diss.-Arbeit, München 1970
- WRBA H., RIPOLI-GOMEZ M. : Zur Biologie des heterolog wachsenden Yoshida-Sarkoms (Stamm MY-RY). Z. Krebsforschung 63, 580-585 (1960)
- WÜST G. P. : Sensibilitätstestung maligner Tumoren gegen Zytostatika in vitro und in vivo Münch. med. Wschr. 115, 18, 839-842 (1973)
- YARBO J. W. : Further Studies On The Mechanism Of Action Of Hydroxyurea Canc. Res. 28, 1082-1087 (1968)
- YOUNG Ch., SCHOCHETMAN G., KARNOFSKY D. : Hydroxyurea-induced Inhibition Of Deoxyribonucleotide Synthesis; Studies In Intact Cells Canc. Res. 27, 526-534 (1967)
- ZOLLINGER H. U. : Pathologische Anatomie Thieme-Verlag, 1971

Zu danken habe ich vor allem meinem
Doktorvater Herrn Dr. med. R. Harten-
stein. Weiterhin gilt mein Dank Herrn
Prof. Dr. med. H. Ehrhart für sein Votum,
Fr. Hüftlein, Frl. Menge und Fr. Vogel
für Ihre medizinisch-technische Unter-
stützung.

LEBENS LAUF

Am 25.1.1950 wurde ich als Sohn von Dr. Josef Pfundmair und Agathe Pfundmair, geb. Stich, in Friedberg/Schwaben geboren.

Von 1956-1960 besuchte ich die Volksschule in Aichach. Dann trat ich in das Humanistische Gymnasium bei St. Stephan in Augsburg ein und legte dort 1970 meine Reifeprüfung ab. Anschließend studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Medizin. 1976 bestand ich das Staatsexamen in Medizin. Seit 1977 bin ich als Medizinalassistent im Kreiskrankenhaus München-Pasing tätig.

